



Annexin V - HS Fluor 647/PI Apoptosis Detection Kit

Annexin V-HS Fluor 647/PI 细胞凋亡检测试剂盒

目录号：CW9103

保存条件：2-8°C避光冷藏，请勿冻存。

产品内容

Component	CW9103T 10 T	CW9103M 50 T
1× Annexin V 结合缓冲液	10 mL	50 mL
Annexin V-HS Fluor 647	50 μL	250 μL
PI	100 μL	500 μL

光谱特性

Annexin V-HS Fluor 647: Ex/Em = 650/665 nm

PI: Ex/Em = 535/617 nm (with DNA)

产品简介

Annexin V-HS Fluor 647/PI 细胞凋亡检测试剂盒提供了一种快速简便的方法, 通过标记早期凋亡细胞 (远红) 和坏死或晚期凋亡的细胞 (红色), 用于检测细胞凋亡水平。产品可以使用流式细胞仪或其它荧光检测设备进行检测。

Annexin V (膜联蛋白-V) 是一种分子量为 35-36KD的Ca²⁺ 依赖性磷脂结合蛋白, 可与磷脂酰丝氨酸 (PS) 选择性结合。磷脂酰丝氨酸 (PS) 主要分布在细胞膜内侧, 即与细胞浆相邻的一侧。在细胞发生凋亡的早期, 不同类型的细胞都会把磷脂酰丝氨酸外翻到细胞表面, 暴露在细胞外环境中。此时, 使用远红荧光探针 HS Fluor 647 标记的 Annexin V, 即 Annexin V-HS Fluor 647, 与外翻的磷脂酰丝氨酸 (PS) 结合, 就可用流式细胞仪或荧光显微镜直接检测到磷脂酰丝氨酸的外翻这一细胞凋亡的重要特征。对于坏死或晚期凋亡的细胞, 由于细胞完整性已经被破坏, Annexin V-HS Fluor 647 则可以进入胞浆与处于磷脂层内侧的PS结合, 从而使坏死细胞呈现远红外荧光。

碘化丙啶 (Propidium Iodide, PI) 是一种 DNA 结合染料, 它可以染色坏死细胞或凋亡晚期丧失细胞膜完整性的细胞的细胞核。PI可以由488, 532或546 nm的激光激发, 呈现红色荧光。

使用方法

1. 实验设计

空白管: 阴性对照组细胞, 不加Annexin V-HS Fluor 647。用于调节电压。收集细胞。

单染管: 阳性对照组细胞, 只加Annexin V-HS Fluor 647/只加PI。用于调节补偿。

检测管: 经过处理的细胞, 加Annexin V-HS Fluor 647和PI。用空白管和单染管调节好电压补偿后, 获得所需要的流式数据。

2. 收集细胞

2.1 对于悬浮细胞:

a. 在进行完细胞凋亡刺激后, 1000 rpm离心5 min, 弃上清, 收集细胞, 用PBS轻轻重悬细胞并计数。

注意: PBS重悬不能省略, PBS重悬的过程同时也起到了洗涤细胞的作用, 可以保证后续Annexin V-HS Fluor 647的结合。

b. 取 5×10^4 - 1×10^5 个重悬的细胞, 1000 rpm离心5 min, 弃上清, 加入100 μ L 1 \times Annexin V 结合缓冲液轻轻重悬细胞。

c. 加入5 μ L Annexin V-HS Fluor 647, 轻轻混匀。

d. 加入5 μ L PI染色液, 轻轻混匀。

e. 室温 (20-25 $^{\circ}$ C) 避光孵育10-15 min。可以使用铝箔进行避光。孵育过程中可以重悬细胞2-3次以改善染色效果。

2.2 对于贴壁细胞:

a. 把细胞培养液吸出至一合适离心管内, PBS洗涤贴壁细胞一次, 加入适量胰酶细胞消化液(不含EDTA) 消化细胞。室温孵育至轻轻吹打可以使贴壁细胞吹打下来时, 吸除胰酶细胞消化液。需避免胰酶的过度消化。

注意: 对于贴壁细胞, 胰酶消化步骤很关键。胰酶消化时间如果过短, 细胞需要用力吹打才能脱落, 容易造成细胞膜的损伤, 从而导致细胞坏死的假阳性; 消化时间如果过长, 同样易造成细胞膜损伤而出现细胞坏死的假阳性, 甚至会影响细胞膜上磷脂酰丝氨酸与Annexin V-HS Fluor 647的结合从而干扰对于细胞凋亡的检测。

b. 加入上步中收集的细胞培养液, 把细胞轻轻吹打下来, 转移到离心管内, 1000 rpm离心5 min, 弃上清, 收集细胞, 用PBS轻轻重悬细胞并计数。

注意: 加入上步中的细胞培养液非常重要, 一方面可以收集已经悬浮的发生凋亡或坏死的细胞, 另一方面细胞培养液中的血清可以有效抑制或中和残留的胰酶。残留的胰酶会消化并降解后续加入的Annexin V-HS Fluor 647, 导致染色失败。

c. 取 5×10^4 – 1×10^5 个重悬的细胞, 1000 rpm离心5 min, 弃上清, 加入100 μ L $1 \times$ Annexin V 结合缓冲液轻轻重悬细胞。

d. 加入5 μ L Annexin V-HS Fluor 647, 轻轻混匀。

e. 加入5 μ L PI 染色液, 轻轻混匀。

f. 室温(20–25 $^{\circ}$ C)避光孵育10–15 min。可以使用铝箔进行避光。孵育过程中可以重悬细胞2–3次以改善染色效果。

3. 结果分析:

3.1 流式细胞仪检测:

a. 孵育完成后, 可直接加入400 μ L $1 \times$ Annexin V 结合缓冲液重悬细胞, 立即上机检测, Annexin V-HS Fluor 647 由 647 nm 激光激发, 检测荧光发射光谱在 647 nm 处 (APC 通道), PI通道发射光谱约在 617 nm 处。

b. 在双变量流式细胞仪的散点图上, 左下象限显示活细胞, 为Annexin V-HS Fluor 647-/PI-; 右下象限为早期凋亡细胞, 为 (Annexin V-HS Fluor 647+/PI-); 右上象限是坏死与晚期凋亡细胞, 为 (Annexin V-HS Fluor 647+/PI+); 左上象限显示裸核细胞, 为 (Annexin V -HS Fluor 647-/PI+)。

3.2 荧光显微镜检测:

a. 1000 rpm离心5 min, 收集细胞, 用400 μ L $1 \times$ Annexin V 结合缓冲液轻轻重悬细胞。将细胞移至96孔板中沉降片刻或进行细胞涂片后, 置于荧光显微镜下观察。

b. Annexin V-HS Fluor 647可用APC适用的滤光片, PI可用Cy3或者Texas适用的滤光片。

注意事项

1. 使用前请将产品瞬时离心至管底，再进行后续实验。
2. 为降低细胞凋亡进程，孵育过程可在冰上操作，但孵育时间至少延长至30 min。
3. 由于细胞凋亡是一个快速的过程，建议样品在染色后 1h之内进行分析。
4. 对于贴壁细胞，消化是一个关键步骤。贴壁细胞诱导细胞凋亡时如有漂浮细胞，需收集漂浮细胞和贴壁细胞后合并染色。

处理贴壁细胞时要小心操作，尽量避免人为的损伤细胞。胰酶消化时间过短，细胞需要用力吹打才能脱落，容易造成细胞膜的损伤，PI摄入过多；消化时间过长，细胞膜同样易造成损伤，甚至会影响细胞膜上磷脂酰丝氨酸的结合。消化时将胰酶铺满孔板底后，轻摇时胰酶与细胞充分接触，然后倒掉大部分胰酶，利用剩余的少量胰酶再消化一段时间，待细胞间空隙增大，瓶底呈花斑状即可终止。在消化液中尽量不用EDTA，EDTA会影响Annexin V与PS的结合。

5. 贴壁细胞用胰蛋白酶消化后，建议在最佳培养条件和培养基中恢复约30 min后染色，避免假阳性。
6. 为了避免洗涤细胞时损失细胞，在吸液时可以用大的Tip头套上小的Tip头吸液。
7. 染料的最佳使用浓度由具体实验要求确定。
8. 荧光染料均存在淬灭问题，保存和使用过程中请尽量注意避光，以减缓荧光淬灭。
9. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。